



## **Biologia reprodutiva das abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) e biotecnologias aplicadas à sua conservação**

*Reproductive biology of Africanized bees (Apis mellifera) and biotechnologies applied to their conservation*

**Andréia Maria da Silva<sup>1\*</sup>, Lucas da Silva Morais<sup>2</sup>, Romario Parente dos Santos<sup>1</sup>, Alexandre Rodrigues Silva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil;

<sup>2</sup>Centro Tecnológico de Apicultura e Meliponicultura do estado do Rio Grande do Norte, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil

### **Resumo**

A biodiversidade das abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) encontra-se sob grande ameaça e, neste cenário as investigações acerca da biologia reprodutiva, alguns aspectos ainda incipientes, bem como métodos aprimorados para a inseminação instrumental e criopreservação de gametas podem ser ferramentas preciosas para a conservação *in situ* e *ex situ* de subespécies e ecótipos. O entendimento e adoção de ferramentas como estas mencionadas, podem auxiliar na seleção de características de interesse para os criadores, assim como, nos esforços para a conservação de populações de abelhas ameaçadas.

**palavras-chave:** conservação, inseminação instrumental, criopreservação, zangões

### **Abstract**

*The biodiversity of Africanized bees (Apis mellifera) is under great threat and, in this scenario, investigations about reproductive biology, some aspects are still incipient, as well as improved methods for instrumental insemination and cryopreservation of gametes can be precious tools for ex situ and in situ of subspecies and ecotypes can be contemplated. The understanding and adoption of tools such as those mentioned can help in the selection of characteristics of interest to breeders, as well as those committed to the conservation of endangered bee populations.*

**Keywords:** conservation, instrumental insemination, cryopreservation, drones

### **Introdução**

A espécie *Apis mellifera* do Brasil é denominada abelha africanizada devido à hibridização entre abelhas Europeias, introduzidas no Brasil desde o século XIX, e as abelhas africanas, introduzidas em 1957 (Collet et al., 2006). Estas apresentam uma elevada importância econômica com a produção de mel principalmente (Wolf, 2007). Ainda, têm grande importância ecológica pois são responsáveis pela polinização de diversas espécies de plantas (Garibaldi et al., 2014).

No entanto, uma preocupação mundial vem sendo discutida devido a diminuição das abelhas *Apis* sem causa específica, tendo seu primeiro relato em 2006. Esse fato foi denominado desordem do colapso das colônias (Pires et al., 2016). Acredita-se que não exista um único fator atuando neste declínio, mas um conjunto de fatores (Pires et al., 2016). Com base nos aspectos supracitados, as ferramentas conservacionistas são extremamente importantes para garantir o desenvolvimento e sobrevivência das colônias (Wegener et al., 2014).

Neste contexto, a total elucidação dos mecanismos que governam a biologia reprodutiva e a utilização das biotécnicas aplicadas à reprodução se apresentam como ferramentas essenciais para a conservação desses exemplares. Portanto, a presente revisão tem como objetivo principal apresentar as diferenças anatômicas e biológicas entre as diferentes castas de abelhas africanizadas, sua forma de acasalamento natural, inseminação instrumental e conservação de sêmen.

<sup>1</sup>Correspondência: andreia.m.silva@hotmail.com

Recebido: 24 de abril de 2023

Aceito: 25 de abril de 2023



### Diferenças anatômica e fisiológica dos órgãos reprodutivos entre castas

As *Apis melliferas* são divididas em três castas: a rainha, as operárias e os zangões, cada uma com morfologia e funções distintas. A rainha tem como função a ovoposição de ovos diploides e haploides, além disso, produzem o feromônio da glândula da mandíbula que atua na atração de zangões para o acasalamento, manutenção da unidade da colmeia, inibição do desenvolvimento dos ovários das operárias e a produção de rainhas (Free, 1987; Ronai *et al.*, 2016). No tocante ao seu órgão reprodutivo, o mesmo é constituído por dois ovários, cada ovário é formado por diversos ovariolos, e um par de oviduto laterais que culminam em um oviduto comum que se liga a vagina. Em adição, tem-se uma esfera destinada ao armazenamento de espermatozoides denominada espermateca que é ligada à vagina por um pequeno ducto (Dallai, 1975).

Nos ovários, é possível encontrar de 150 a 180 ovariolos, os quais contêm múltiplos oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (Snodgrass, 1956). Os oócitos são ligados a um grupo de células nutridoras que fornecem elementos requeridos pelo gameta feminino em desenvolvimento (Snodgrass, 1956). À medida que o ovócito se aproxima do oviduto, as células nutridoras transferem seu conteúdo restante para o oócito e morrem quando o oócito completa seu desenvolvimento (Aamidior *et al.*, 2022). A rainha é alimentada com geleia real desde seu estágio de larva, o que a faz desenvolver suas características específicas. Essa alimentação também estimula a produção de hormônio juvenil, o qual atua diretamente no número de ovariolos, assim como na síntese de vitelogenina (Winston, 2003; Barchuk *et al.*, 2002; Piulachs *et al.*, 2003).

As operárias, também fêmeas diploides, são responsáveis por todo o trabalho na colmeia e apresentam os mesmos órgãos reprodutivos que a abelha rainha (Dallai, 1975). Estas têm em torno de quatro ovariolos por ovário, esse baixo número está associado a baixa concentração do hormônio juvenil durante o período larval (Winston, 2003). Nesta casta, a oogênese é iniciada, porém é interrompida antes da vitelogenese pelo feromônio da glândula da mandíbula da rainha que desencadeia morte celular programada, inibindo assim a produção dos ovos (Ronai *et al.*, 2016). Na ausência de rainha, as operárias retomam a oogênese e ovopõem ovos haploides, mas são incapazes de colocar ovos diploides, pois não acasalam com os zangões (Verma e Karol, 1992; Oldroyd e Osborne, 1999).

Os zangões são os únicos machos da colmeia, tendo como função primordial a reprodução (Kovac *et al.*, 2009). O órgão reprodutivo dos zangões é composto por testículos pareados, vasos eferentes, ductos deferentes e ductos ejaculatórios, glândulas sexuais acessórias (vesículas seminais e glândulas mucosas) e endófalco (Klein *et al.*, 2021). No tocante a espermatogênese, esta dura 25 dias em zangões africanizados, e ocorre durante o crescimento larval, no qual todas as espermatogônias são diferenciadas em espermatozoides, logo, o indivíduo emerge com produção espermática completa (Lago *et al.*, 2020). Em seguida, os espermatozoides migram dos testículos para as vesículas seminais e então os machos são considerados sexualmente maduros (Klein *et al.*, 2021).

### Cópula e armazenamento de espermatozoides na espermateca

Após a emersão, uma abelha rainha atinge a maturidade sexual entre 5 a 10 dias de idade, momento no qual são iniciados os voos de acasalamento (Souza, 2009). Ela fará de um a três voos de acasalamento nos dias subsequentes e acasalará com 12 ou mais zangões ao longo desses voos (Souza, 2009). É importante salientar, que os feromônios produzidos na mandíbula da rainha servem para atrair os zangões, os quais também produzem feromônios na mandíbula que atuam na formação da zona de congregação, local onde os zangões ficam juntos aguardando uma rainha virgem, assim como na atração pelas mesmas (Winston, 2003). Em alguns dias após concluir o processo de acasalamento, a rainha iniciará o comportamento de postura de ovos e nunca mais acasalará durante seus anos de vida (Kocher *et al.*, 2008).

Existem duas teorias sobre como o sêmen dos zangões é conservado na espermateca, a primeira defende que o sêmen de cada zangão permanece armazenado em pacotes (Taber, 1955; Martinho, 1979), de forma que essa mudança de pacotes de espermatozoide pode ser detectada na mudança de fenótipo das operárias de tempos em tempos, como comprovado por Martinho (1979). A segunda vertente defende que no momento da migração dos espermatozoides para a espermateca, o sêmen dos zangões mistura-se homogeneamente, sendo estocado desta forma (Moritz, 1983; Page-Jr *et al.*, 1984).

### Inseminação artificial



O primeiro passo para inseminação artificial é a coleta de sêmen dos zangões. Para isso é necessário usar zangões maduros sexualmente, nos quais o sêmen é coletado pela eversão do endófalo (Cobey *et al.*, 2013). O estímulo para eversão é realizado manualmente, onde é feita uma pressão no abdômen, e em seguida, a compressão natural do mesmo e eversão do endófalo. Assim, o sêmen fica na ponta do endófalo ao lado de um muco branco (Mendes, 2008). Cada zangão produz em torno de 1 uL de sêmen, o qual é coletado com auxílio de um capilar conectado a uma seringa Harbo, sendo normalmente utilizados de 8 a 12 uL de sêmen por rainha, logo cada rainha é inseminada com um pool de sêmen (Cobey, 2007; Mendes, 2008; Cobey, 2016).

A rainha é inseminada durante 5 a 12 dias após a emergência, com auxílio de um equipamento específico para sua manipulação. Primeiro, estas são presas em um tubo de suporte, então são anestesiadas com CO<sub>2</sub>. Em seguida, para expor o orifício vaginal da rainha, as placas abdominais são separadas usando um par de ganchos que estão presentes no equipamento de inseminação e com auxílio de uma capilar de vidro uma válvula presente na vagina é contornada e o sêmen depositado (Cobey, 2016; Cobey *et al.*, 2013). O sucesso da inseminação pode ser verificado pela dissecação da espermateca ou pela avaliação da ovoposição (Cobey *et al.*, 2013).

### Criopreservação de sêmen

Os primeiros estudos de criopreservação do sêmen de zangões foram realizados durante as décadas de 70 e 80 (Harbo, 1983). O primeiro passo para criopreservação é a coleta de sêmen, que já foi descrita anteriormente, sendo em seguida realizada a diluição em proporções de 1:1 até 1:12 (Taylor *et al.* 2009; Hopkins *et al.*, 2012). Com o aperfeiçoamento dos meios de diluição, diversos diluentes já foram testados para a criopreservação de sêmen em abelhas (Tab. 1). É importante mencionar que o dimetilsulfóxido (DMSO) é o crioprotetor de escolha para a criopreservação do sêmen em abelhas.

Após a diluição, é realizada a criopreservação, a qual tem sido principalmente conduzida por meio de curvas lentas (Tab. 1). A curva de congelamento mais utilizada tem sido a lenta com auxílio de máquinas de congelamento na qual há uma diminuição de 3 °C por minuto até atingir -8 °C, depois muda-se a taxa de arrefecimento para 15 °C/min até atingir -120 °C (Alcay *et al.* 2019). Em adição, o protocolo de criopreservação sem uso de máquinas já foi relatado, no qual as amostras foram resfriadas a 15 °C por 2 horas, seguido de exposição ao vapor de nitrogênio e finalmente armazenados em botijão criobiológico (Dadkhah *et al.* 2016). Ainda outra opção é o uso da criopreservação com auxílio do dispositivo de S-CryoLock® ou tubos de microdiálise, o qual é submerso ao vapor de nitrogênio e armazenado (Auth e Hopkins, 2021).

No tocante aos resultados, em 1983 foi descrito um relato de criopreservação de sêmen de zangões com uso de inseminação instrumental como ferramenta de avaliação, no qual obteve-se crias de operária, provando que o protocolo foi eficiente. Em seguida a maioria dos estudos focaram nas características qualitativas dos espermatozoides, os quais mostraram resultados variáveis a depender do protocolo utilizado, com motilidade variando de 40 a 70%, viabilidade de 60 a 80%, funcionalidade de membrana de 59 a 72% e atividade mitocondrial de 60 a 79% (Alcay *et al.*, 2019; Auth and Hopkins, 2021; Wegener *et al.*, 2012). Em 2020, Rajamohan *et al.*, avaliando diferentes diluentes na criopreservação de sêmen de zangão obtiveram 76.8% de operárias nascidas de rainha inseminada com sêmen descongelado.

### Considerações finais

Em resumo, a biologia reprodutiva das abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) apresenta uma rede complexa de eventos necessários para o processamento e desencadeamento dos eventos reprodutivos. Contudo, muitos desses mecanismos que governam a fisiologia reprodutiva nestes animais ainda não foram completamente elucidados, demandando grandes esforços em pesquisas sobre tal assunto, que é algo imprescindível para garantir tanto a conservação como também a seleção de características de interesse zootécnico. A inseminação instrumental e a criopreservação de sêmen são técnicas promissoras, porém desafiadoras, para a reprodução seletiva e a conservação genética desses animais. É importante que essas técnicas sejam aplicadas de forma cuidadosa, levando em consideração os aspectos éticos, ecológicos e de bem-estar animal, visando a sustentabilidade e a saúde das abelhas.



Tabela 1. Protocolos convencionais de criopreservação já aplicados para abelhas africanizadas (*Apis mellifera*)

Objetivos	Meios de diluição	Protocolos de criopreservação	Principais resultados encontrados	Referência
<b>Ciopreservação de sêmen de zangão</b>	Solução tampão a base de sulfato de sódio e sulfato de diidroestreptomicina acrescido de 25 % DMSO e 25% gema de ovo	Freezer programável	Rainhas inseminadas com sêmen descongelado, após dois anos, produziram 8% de crias operárias.	(Harbo, 1983)
<b>Avaliar diferentes protocolos de criopreservação</b>	Citrato de sódio, Bicarbonato de sódio, Cloreto de potássio, Amoxicilina, Catalase (pH de 8,1; 280 mOsmol)	Freezer programável	Sêmen diluindo na proporção de 1:12 usando 10% de DMSO proporcionou melhores taxas de viabilidade	(Taylor et al., 2009).
<b>Avaliar o uso de sêmen criopreservado em inseminação instrumental</b>	Fosfato monossódico, fosfato dissódico, DMSO e gema de ovo (pH 7,2)	Freezer programável	Dois de cinco rainhas inseminadas com sêmen descongelados produziram majoritariamente operárias.	(Hopkins et al., 2012)
<b>Avaliar diferentes diluentes</b>	Diluyente base (DB): Tris, glicose, ácido cítrico, glicerol, DMSO e estreptomicina DB + 0,5 % de lecitina de soja DB + 2% de lecitina de soja DB + 20% de gema de ovo	Refrigeração a 5°C por 2 horas, em seguida foi colocado em vapor de nitrogênio e então armazenado	O diluyente base adicionado de 20% de gema de ovo foi o que apresentou melhor motilidade pós-descongelação	(Dadkhah et al., 2016)
<b>Desenvolver um método de preservação de sêmen de zangões</b>	Penicilina, Estreptomicina, TES, Tris base, EDTA, Fosfato de sódio dibásico, Citrato de sódio, Glicose, Arginina, Glicina, Prolina, Catalase, Albumina de soro bovino, Cloreto de Potássio, Cloreto de Sódio, Bicarbonato de Sódio, DMSO e Gema de ovo.	Freezer programável	Sêmen de zangão armazenados a 16°C sobrevivem até 9 meses, e quando criopreservados foram descongelados com viabilidade de 76 ± 5%.	(Paillard et al., 2017)
<b>Avaliar uso de crioprotetor intra e extracelular</b>	Diluyente básico: Tris, ácido cítrico, glicose e estreptomicina (pH 7,0). T1 - 25% glicerol + 25% gema de ovo centrifugada T2 - 25% DMSO + 25% gema de ovo centrifugada T3 - 25% glicerol + 25% gema de ovo T4 - 25% DMSO + 25% gema de ovo centrifugada.	Refrigeração a 5°C por 50 minutos, em seguida foi colocado em vapor de nitrogênio e armazenado	Os tratamentos T2 e T3 proporcionaram melhor motilidade pós- descongelação.	(Loeza-Concha et al., 2019)
<b>Avaliar uso de geleia real na criopreservação de sêmen de zangões.</b>	Diluyente base: Citrato de sódio, bicarbonato de sódio, cloreto de potássio, amoxicilina, catalase e 10% DMSO. (pH 8,1). Adicionada as concentrações de 1%, 2%, 4% e 8% de geleia real	Freezer programável	O diluyente acrescido de 1% de geleia real obteve as maiores taxas de motilidade espermática e integridade acrossomal.	(Alcay et al., 2019)
<b>Avaliar diferentes métodos de criopreservação</b>	Fosfato monossódico, fosfato dissódico e gema de ovo (pH 7,2). Adicionada as concentrações de 20%, 40%, 60% de DMSO	Freezer programável Imerso no nitrogênio ou Colocado no vapor de nitrogênio usando CryoLock ou tubos de microdiálise	O sêmen criopreservado em vapor de nitrogênio usando tubos de microdiálise com 20% de DMSO foi semelhante ao controle fresco e congelado por freezer programável.	(Auth and Hopkins, 2021)



## Referências

- Aamidor SE, Cardoso-Júnior CAM, Harianto J, Nowell CJ, Cole L, Oldroyd BP, Ronai I.** Reproductive plasticity and oogenesis in the queen honey bee (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol*, v.136, e104347, 2022.
- Alcay S, Cakmak S, Cakmak I, Mulkpınar E, Gokce E, Ustuner B, Sem H, Nur Z.** Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders. *Cryobiology*, v.87, p.28-31, 2019.
- Auth CA, Hopkins BK.** Nitrogen vapor immersion: An accessible alternative for honey bee (*Apis mellifera* L.) semen cryopreservation. *Cryobiology*, v.100, p.12-18, 2021.
- Barchuk AR, Bitondi MMG, Simões ZLP.** Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *J Insect Sci*, v.2, p.1-8, 2002.
- Cobey SW, Tarpy DR, Woyke J.** Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *J Apic Res*, v.52, 2013.
- Cobey SW.** 2007. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*, v.38, p.390-410, 2007.
- Cobey SW.** An Introduction to Instrumental Insemination of Honey Bee Queens. *Bee World*, v.93, p.33-36, 2016.
- Collet T, Ferreira KM, Arias MC, Soares AEE, Del Lama MA.** Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI-COII patterns. *Heredity*, v.97, p.329-335, 2006.
- Dadkhal F, Nehzati-Paghaleh G, Zhandi M, Emamverdi M, Hopkins BK.** Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol. *J Apicult Res*, v.55, p.279-283, 2016.
- Dallai R.** Fine structure of the spermatheca of *Apis mellifera*. *J Insect Physiol*, v.21, p.89-109, 1975.
- Free JB.** Pheromones of social bees. London: University Press Cambridge, Chapman and Hall, 1987. p. 236.
- Garibaldi LA, Steffan-dewenter I, Winfree R, Aizen MA, Bommarco R, Cunningham SA, Kremen C, Carvalheiro LG.** Wild Pollinators Enhance Fruit Set of Crops Regardless of Honey Bee Abundance. *Science*, v.339, p.1608-1611, 2014.
- Harbo JR.** Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa after two years in liquid nitrogen (-196 C). *Ann Entomol Soc Am*, v.76, p.890-891, 1983.
- Hopkins BK, Herr C, Sheppard WS.** Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reprod Fertil Dev*, v.24, p.1079-1083, 2012.
- Klein CD, Kozii IV, Wood SC, Koziy RV, Zabrodski MW, Dvilyuk I, De Mattos IM, Moshynskyy I, Honaramooz A, Simko E.** Testicular Changes of Honey Bee Drones, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), during Sexual Maturation. *J Insect Sci*, v.21, p.1-12, 2021.
- Kocher SD, Richard FJ, Tarpy DR, Grozinger CM.** Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, v.9, p.1-15, 2008.
- Kovac H, Stabentheiner A, Brodschneider R.** Contribution of honeybee drones of different age to colonial thermoregulation. *Apidologie*, v.40, p.82-95, 2009.
- Lago DC, Martins JR, Dallacqua RP, Santos DE, Bitondi MMG, Hartfelder K.** 2020. Testis development and spermatogenesis in drones of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie*, v.51, p.935-955, 2020.
- Loeza-Concha H, Domínguez-Rebolledo Á, Copas-Medina K, Vivas-Rodríguez J, Escalera-Valente F, Ramón-Ugalde J.** Effect of egg yolk on sperm cryopreservation of drone (*Apis mellifera*). *Aba Vet*, v.9, p.1-11, 2019.
- Martinho MR.** *Competição reprodutiva entre machos de Apis mellifera L. e migração de espermatozoides para espermoteca de rainhas.* 1979. 134f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto, 1979.
- Mendes AMC.** Inseminação artificial em abelhas rainhas. *Agroforum*, v.16, p. 31-36. 2008.
- Moritz RFA.** Homogenous mixing of honeybee semen. *J Apic Res*, v.22, p.249-255, 1983.
- Oldroyd BP, Osborne KE.** The evolution of worker sterility in honeybees: the genetic basis of failure of worker policing. *Proc Biol Sci*, v.266, e1335, 1999.
- Page-Jr RE, Kimsey RB, Laidlaw-Jr HH.** Migration and dispersal of spermatozoa in spermatheca of



- queen honeybees (*Apis mellifera* L.). *Experientia*, v.40, p.182-184, 1984.
- Paillard M, Rousseau A, Giovenazzo P, Bailey JL.** Preservation of domesticated honey bee (Hymenoptera: Apidae) drone semen. *J Econ Entomol*, v.110, p.1412-1418, 2017.
- Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuk AR, Cruz J, Simoes ZL, Belles X.** The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem Mol Biol*, v.33, p.459-465, 2003.
- Pires CSS, Pereira FM, Lopes MTR, Nocelli RCF, Malaspina O, Pettis JS, Teixeira ÉW.** Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?. *Pesqui Agropecu Bras*, v.51, p.422-442, 2016.
- Rajamohan, A., Danka, RG., Hopkins, BK., Rinehart, JP.** A non-activating diluent to prolong in vitro viability of *Apis mellifera* spermatozoa: Effects on cryopreservation and on egg fertilization. *Cryobiology*, v.92, p.124-129, 2020.
- Ronai I, Oldroyd BP, Vergoz V.** Queen pheromone regulates programmed cell death in the honey bee worker ovary. *Insect Mol Biol*, v.25, p.646-652, 2016.
- Souza DA.** de, 2009. *Aspectos reprodutivos de rainhas africanizadas (Apis mellifera L.): influência do peso ao nascer no desempenho das colônias.* 2009. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Ribeirão Preto, 2009.
- Snodgrass RE.** Anatomy of the Honey Bee. Cornell University Press: JSTOR, 1956. p.352.
- Taber S.** Sperm distribution in the spermathecae of multiple-mated queen honey bees. *J Econ Entomol*, v.48, p.522-525, 1955.
- Taylor MA, Guzmán-Novoa E, Morfin N, Buhr MM.** Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*, v.72, p.149-159, 2009.
- Verma S, Karol A.** Chromosomal analysis of the eggs and ovaries of the laying workers of *Apis cerana* F. *Apidologie*, v.23, p.285-289, 1992.
- Wegener J, May T, Kamp G, Bienefeld K.** A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology*, v.69, p.236-242, 2014.
- Winston ML.** A Biologia da Abelha. Porto Alegre: Magister, 2003. p.276.
- Wolff LF.** Apicultura Sustentável na Propriedade Familiar de Base Ecológica. *Circular Técnica*, Embrapa Pelotas, n. 64, 2007. Disponível em <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/746073/1/Circular64.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- Zennouche OS, Iguer-Ouada M, Benmeradi N, Mohammedi A.** Structure and organization of the spermatozoa within the spermatheca of honey bee queens *Apis mellifera intermissa* L. *J Apic Res*, v.54, p.577-581, 2016.
-